

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA E DESENVOLVIMENTO REGIONAL
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

LUCAS LIMA ALVES

EFEITO DA ADIÇÃO DE COPRODUTOS DA VINIFICAÇÃO NA ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE DE LEITES FERMENTADOS PROBIÓTICOS

João Pessoa

2017

LUCAS LIMA ALVES

EFEITO DA ADIÇÃO DE COPRODUTOS DA VINIFICAÇÃO NA ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE DE LEITES FERMENTADOS PROBIÓTICOS

Trabalho de Conclusão do Curso Superior de Tecnologia de Alimentos, do Centro de Tecnologia e Desenvolvimento Regional, da Universidade Federal da Paraíba, apresentado como pré-requisito para obtenção do título de Tecnólogo em Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Ismael Ivan Rockenbach

Co-orientadora: Profa. Dra. Haíssa Roberta Cardarelli

João Pessoa

2017

A474e Alves, Lucas Lima.

Efeito da adição de coprodutos da vinificação na atividade antioxidante de leites fermentados probióticos. [recurso eletrônico] / Lucas Lima Alves. -- 2017.

41 p. : il. color. + CD.

Sistema requerido: Adobe Acrobat Reader.

Orientador: Dr. Ismael Ivan Rockenbach.

Co-Orientador: Dra. Haíssa Roberta Cardarelli.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação - Tecnologia de Alimentos) – CTDR/UFPB.

1. Alimentos funcionais. 2. Uva – semente - farinha. 3. Compostos fenólicos. 4. Atividade antioxidante. I. Rockenbach, Ismael Ivan. II. Cardarelli, Haíssa Roberta. III. Título.

CDU: 637.146(043.2)

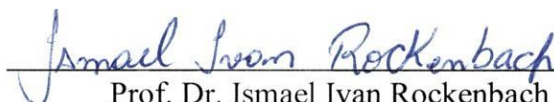
LUCAS LIMA ALVES


EFEITO DA ADIÇÃO DE COPRODUTOS DA VINIFICAÇÃO NA ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE DE LEITES FERMENTADOS PROBIÓTICOS

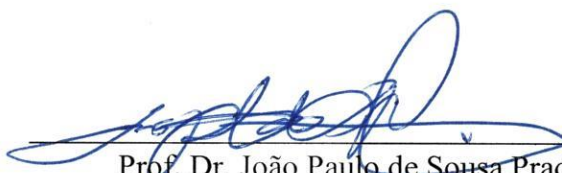
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade Federal da Paraíba, como parte
das exigências para a obtenção do título de
Tecnólogo de Alimentos.

João Pessoa, 05 de Junho de 2017.

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. Ismael Ivan Rockenbach
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)
(Orientador e Presidente da Banca Examinadora)


Prof. Dra. Haíssa Roberta Cardarelli
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)
(Membro da Banca Examinadora)


Prof. Dr. João Paulo de Sousa Prado
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)
(Membro da Banca Examinadora)

Dedico aos meus pais Severino Mendes Alves e Junia de Sousa Lima Alves.

Aos meus queridos irmãos Letícia, Leandro e Larissa.

À minha amada, Thaís Flor.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por ter me proporcionado esta grande oportunidade de poder realizar um sonho, e estar sempre comigo, me dando força, me ajudando e capacitando nos momentos difíceis em que passei, além de todas as bênçãos derramadas em minha vida.

Aos meus pais, por serem os grandes exemplos da minha vida, pelo carinho e zelo, como também por todo o esforço para que hoje eu estivesse aqui. Sou infinitamente grato pelas vossas vidas.

Aos meus irmãos por serem bênçãos de Deus em minha vida e de toda nossa família, além de todo apoio.

A meu amor, por todo apoio, incentivo, carinho e paciência. Nos momentos em que a fé estava pequena era você quem chegava e dizia que iria dar certo. Muito obrigado.

À minha avó Maria, a quem amo muito, por ser esse anjo que Deus colocou aqui na terra para cuidar tão bem de nós.

A minhas tias Silene e Telma, pelo carinho e cuidado, e pelos muitos conselhos, sempre buscando ensinar o melhor caminho.

Aos meus tios Jário e Jacio, por todo apoio nessa caminhada, com palavras, com atitudes e orações.

A toda minha família querida, por todo carinho, atenção, pela alegria que tenho em ter vocês em minha vida.

Aos meus colegas de curso, Lucas Samid, Jéssica, Ruthchelly, e em especial à minha amiga Débora, pelo aprendizado compartilhado em toda essa caminhada juntos.

Ao meu professor e orientador Ismael Rockenbach, por todo apoio, incentivo e dedicação, para que este trabalho fosse realizado. Por mostrar que para obtenção de bons resultados é necessário demandar um maior esforço, e também agradecer pelos fins de semana, dias e noites que foram necessários abrir mão para que este trabalho chegasse ao fim. Muito obrigado, que Deus possa lhe recompensar grandemente.

A todos meus professores do nosso curso de Tecnologia de Alimentos, por toda dedicação e conhecimento transmitido.

Aos técnicos dos laboratórios, em especial o técnico, aluno e amigo João Bosco, pelas dicas e por toda a ajuda com as análises.

À UFPB, por ter me proporcionado a realização desta graduação.

A todos que contribuíram, muito obrigado!

“Aquele que leva a preciosa semente, andando e chorando, voltará, sem dúvida, com
alegria, trazendo consigo seus molhos”.

Salmos 126:6.

RESUMO

Os componentes naturais de fontes alimentícias têm incentivado o desenvolvimento de novos ingredientes, promovendo a criação de novos nichos de mercado. Mundialmente, tem crescido o interesse por produtos alimentícios nutritivos e saudáveis, o que tem resultado em várias pesquisas na área de produtos lácteos, dentre os quais se destacam os produtos funcionais, especialmente pela adição de probióticos em iogurtes e leites fermentados em geral. Além da adição de probióticos como ingredientes funcionais, também a utilização de ingredientes antioxidantes naturais tem sido vastamente explorada em diversos estudos ao redor do mundo. Várias fontes de antioxidantes naturais são conhecidas, entre elas, uma das fontes mais promissoras são os coprodutos industriais obtidos no processamento das uvas. Assim, o objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de leites fermentados probióticos com adição de coprodutos da vinificação, farinha de semente e farinha de casca de uva, para o incremento das propriedades antioxidantes. Foram utilizadas nos testes as seguintes formulações: 1) Controle; 2) Semente 1%; 3) Semente 3%; 4) Casca 1%; e 5) Casca 3%. Foram realizadas as análises de viabilidade probiótica, análises microbiológicas, análises físico-químicas, além das determinações do conteúdo fenólico total e da atividade antioxidante. Após vários testes para a obtenção do inóculo, as contagens bacterianas de células probióticas atingiram valores de 10^8 UFC/mL, acima do valor mínimo exigido pela legislação para classificação do produto como probiótico, que é de 10^6 UFC/mL. As análises microbiológicas realizadas nos produtos obtidos demonstraram concordância com a legislação. As fermentações foram conduzidas por um tempo de cinco horas estabelecido após a obtenção de pH 4,79 na amostra Controle. A adição de farinha de semente e farinha de casca de uva nas formulações não interferiu de forma significativa no processo fermentativo nas concentrações aplicadas, além de ter proporcionado expressivo aumento no conteúdo fenólico total e na atividade antioxidante dos produtos fermentados, especialmente no caso da farinha de semente de uva. Os resultados permitem concluir que os coprodutos da vinificação apresentam potencial para serem empregados na indústria de derivados lácteos como agentes antioxidantes naturais para o desenvolvimento de produtos funcionais.

Palavras-chave: Leites fermentados. Alimentos funcionais. Coprodutos da vinificação. Compostos fenólicos. Atividade Antioxidante.

ABSTRACT

The natural components of food sources have encouraged the development of new ingredients, resulting in the creation of new market niches. Worldwide, the interest in nutritious and healthy food products has grown, which has resulted in several researches on dairy products, among which functional products are outstanding, especially by the addition of probiotics in yoghurts and fermented milks in general. In addition to using probiotics as functional ingredients, the use of natural antioxidant ingredients has also been extensively explored in several studies around the world. Several sources of natural antioxidants are known, among them one of the most promising sources is the industrial coproducts obtained in the processing of grapes. Thus, the aim of this work was to develop probiotic fermented milks with the addition of coproducts from winemaking - grape seed and grape skin flour, to increase the antioxidant properties. The following formulations were used in the tests: 1) Control; 2) Seed 1%; 3) Seed 3%; 4) Skin 1%; and 5) Skin 3%. Probiotic viability analyzes, microbiological analyzes, physico-chemical analyzes, and total phenolic content and antioxidant activity determinations were performed. After several inoculum optimization tests, bacterial counts of probiotic cells reached values of 10^8 CFU/mL, above the minimum required by the legislation for classification of the product as a probiotic, which is 10^6 CFU/mL. The microbiological analyzes carried out on the products obtained showed results that were in accordance with the legislation. The fermentations were conducted for five hours, this time established after obtaining pH 4.79 in the Control sample. The addition of grape seed and grape skin flours in the formulations did not significantly affect the fermentation process at the concentrations applied, but rather provided an expressive increase in the total phenolic content and antioxidant activity of the fermented products, especially in the sample with addition of grape seed flour. Thus, it is possible to state that the co-products of winemaking have the potential to be used in the dairy industry as natural antioxidants for the development of functional products.

Key words: Fermented milk. Functional food. Coproducts of winemaking. Phenolic compounds. Antioxidant activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Iogurte.....	17
Figura 2 – Leites fermentados.	17
Figura 3 – Leite acidófilo.	17
Figura 4 – Kumys.	18
Figura 5 – Kefir.	18
Figura 6 – Coalhada.....	18
Figura 7 - Fluxograma do processamento dos leites fermentados.	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Formulação final dos leites fermentados.	26
Tabela 2 – Contagens (UFC ¹ /mL) de viabilidade celular probiótica no primeiro e segundo teste para definição de inóculo.	29
Tabela 3 – Contagens (UFC ¹ /mL) de viabilidade celular probiótica no terceiro teste para definição de inóculo.	30
Tabela 4 – Contagens (UFC ¹ /mL) de viabilidade celular no quarto teste para elaboração de fermentados lácteos.	30
Tabela 5 – Contagens (UFC ¹ /mL) de viabilidade celular no quinto teste para elaboração de fermentados lácteos.	31
Tabela 6 – Parâmetros microbiológicos de qualidade dos leites fermentados probióticos.	32
Tabela 7 – Características físico-químicas dos leites fermentados probióticos.	32
Tabela 8 – Conteúdo fenólico total e atividade antioxidante dos leites fermentados probióticos elaborados com adição de farinha de semente e farinha de casca de uva.	34

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

°C - grau Celsius

CTDR - Centro de Tecnologia e Desenvolvimento Regional

EPS – Exopolissacarídeo

GAE - Gallic Acid Equivalent (Equivalente a Ácido Gálico)

g - grama

h - hora

min - minuto

mL – mililitro

MRS – DeMan-Rogosa-Sharpe

NMP – Número Mais Provável

TEAC - Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (Atividade Antioxidante Equivalente ao Trolox)

UHT – Ultra-High Temperature (Temperatura ultra alta)

UFC – Unidades Formadoras de Colônia

UFPB - Universidade Federal da Paraíba

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 OBJETIVOS.....	15
2.1 OBJETIVO GERAL	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1 LEITES FERMENTADOS.....	16
3.1.1 Classificação dos leites fermentados.....	16
3.2 LEITES FERMENTADOS PROBIÓTICOS	19
3.2.1 Benefícios dos leites fermentados probióticos para a saúde	20
3.2.2 Microrganismos utilizados na elaboração de leites fermentados probióticos	21
3.3 ANTIOXIDANTES NATURAIS E OS COPRODUTOS DA VINIFICAÇÃO	22
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1 MATERIAL.....	24
4.2 PREPARO E SELEÇÃO DO INÓCULO	24
4.3 ELABORAÇÃO DOS LEITES FERMENTADOS	25
4.4 DETERMINAÇÕES MICROBIOLÓGICAS NOS LEITES FERMENTADOS	27
4.5 DETERMINAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS NOS LEITES FERMENTADOS	27
4.6 ELABORAÇÃO DE EXTRATOS	27
4.7 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO FENÓLICO TOTAL.....	28
4.8 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	28
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	28
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5.1 TESTES COM O INÓCULO	29
5.2 QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DOS LEITES FERMENTADOS PROBIÓTICOS	31
5.3 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DOS LEITES FERMENTADOS PROBIÓTICOS	32
5.4 CONTEÚDO FENÓLICO TOTAL E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE NOS LEITES FERMENTADOS PROBIÓTICOS	34
6 CONCLUSÃO.....	35
REFERÊNCIAS	36

1 INTRODUÇÃO

Com o passar do tempo, os alimentos se tornaram o canal de bem-estar e saúde, como também, proporcionam a redução de riscos de algumas doenças. Novos componentes naturais tem incentivado as pesquisas e o desenvolvimento de novos ingredientes, provocando a criação de novos nichos de mercado em produtos alimentícios (MATSUBARA, 2001). As mudanças no mercado consumidor obrigam as indústrias de laticínios a se adaptarem às tendências, que rapidamente estão se modificando, de modo que as indústrias precisam manter a liderança tecnológica para aumentar a sua competitividade no segmento de produtos funcionais. Mundialmente tem crescido o interesse por produtos alimentícios nutritivos, saudáveis e de grande aproveitamento, isto resulta em várias pesquisas na área de produtos lácteos. Uma grande parte dessas pesquisas tem destacado os valores nutricionais dos ingredientes lácteos, tal como a importância de uma dieta baseada em produtos lácteos (BRANDÃO, 2002).

O consumo dos alimentos funcionais continua crescendo, além de apresentarem características nutricionais e tecnológicas peculiares, a indústria atende a necessidade daqueles que buscam alimentos inovadores (ARAÚJO, 2007). Ao observar o grande consumo de fermentados, a indústria de laticínios vem desenvolvendo uma gama de produtos funcionais, muitos deles pela adição de probióticos em alimentos como o iogurte e os leites fermentados em geral (SANTOS et al., 2011).

Além da adição de probióticos como ingredientes funcionais, também a utilização de ingredientes antioxidantes naturais tem sido vastamente explorada em diversos estudos ao redor do mundo, o que vem sendo estimulado pela preocupação cada vez maior dos consumidores em relação à segurança dos aditivos sintéticos e com vistas aos benefícios de antioxidantes naturais como seus possíveis substitutos nos alimentos (ROCKENBACH et al., 2011).

Várias fontes de antioxidantes naturais são conhecidas, dentre as quais as frutas cítricas são uma das principais fontes de compostos fenólicos, como a tangerina, o limão e a laranja, além de outras frutas, a exemplo da ameixa, cereja, uva, maçã, pêra e mamão, sendo que nos sucos estes compostos são encontrados em menores quantidades do que quando se compara com a polpa da fruta (PIMENTEL, 2005).

Uma das fontes mais promissoras de compostos antioxidantes que passaram a ser estudadas são os coprodutos industriais obtidos no processamento das uvas. Os coprodutos da vinificação são apresentados com grande potencial para aproveitamento com esta finalidade

(MOURE et al., 2001). Apesar disso, quando os constituintes do vinho e os coprodutos da vinificação passam por uma comparação em relação aos estudos químicos, os dados mostram que os coprodutos da vinificação estão sendo pouco examinados. Contudo, são compostos de grande interesse para a saúde se tratando dos compostos fenólicos (ROCKENBACH et al., 2012). O potencial antioxidante dos compostos fenólicos é de amplo conhecimento na área científica, visto que eles atuam na redução do oxigênio singlete, no bloqueio das reações de oxidação lipídica, como também na quelação de metais. Eles ainda apresentam uma série de propriedades com características farmacêuticas, sendo elas antialérgicas, antiarteriogênicas, anti-inflamatórias, antimicrobianas, antitrombóticas, além de efeitos cardioprotetores e vasodilatadores (MANACH et al., 2005).

Com vistas às propriedades benéficas dos compostos fenólicos e sua aplicação, existe na literatura um estudo que avaliou os efeitos dos polifenóis presentes em semente de uva sobre o crescimento de bactérias ácido-láticas e bifidobactérias em termos de resistência e metabolismo (TABASCO et al., 2011). A hipótese é de que a utilização de cepas mais resistentes/tolerantes aos compostos fenólicos e a otimização das condições de processamento resultem em produtos lácteos fermentados com alta atividade antioxidante, nos quais é assegurada a manutenção de suas propriedades funcionais ao longo do armazenamento refrigerado.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de leites fermentados probióticos com adição de coprodutos da vinificação, farinha de semente e farinha de casca de uva, para o incremento das propriedades antioxidantes.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Testar o inóculo em termos de viabilidade probiótica;
- ✓ Testar os ingredientes e suas proporções na elaboração dos produtos fermentados;
- ✓ Avaliar a viabilidade probiótica e os parâmetros microbiológicos nos leites fermentados;
- ✓ Avaliar características físico-químicas nos produtos fermentados obtidos;
- ✓ Determinar o teor de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante nos leites fermentados probióticos adicionados de farinha de casca e de semente de uva.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 LEITES FERMENTADOS

São considerados leites fermentados os produtos com adição ou não de outras substâncias alimentícias, pela diminuição do pH do leite, como também por coagulação do leite, ou com leite reconstituído, adicionados ou não de outros produtos lácteos, mediante a fermentação láctica por meio da ação de cultivos de microrganismos específicos, dentre os quais devem ser viáveis, ativos e numerosos na obtenção do produto ao longo de todo o prazo de validade (BRASIL, 2007). Por outra definição, os leites fermentados podem ser descritos como preparados lácteos que através do processo de fermentação têm suas características sensoriais modificadas, de forma que este processo pode ser realizado em leite de diferentes espécies animais (ORDÓÑEZ et al., 2005; GALLINA, 2012). O resultado dos processos obtidos na fermentação é de total importância para a indústria de laticínios, pois as características de aroma e sabor estão diretamente ligadas com as atividades fermentativas dos microrganismos (JAY, 2005; ROCHA, 2008).

As bactérias lácticas vêm sendo utilizadas na indústria de lácteos nos mais variados produtos, como culturas starter ou adjuntas em queijos e leites fermentados, por desempenharem a função de contribuir com as características sensoriais e tecnológicas (ORDÓÑEZ et al., 2005). No Brasil, os leites fermentados vêm ganhando espaço na mesa do consumidor, dentre eles o mais conhecido e consumido é o iogurte, sendo este cultivado pela ação das cepas de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* (ANTUNES, 2001).

3.1.1 Classificação dos leites fermentados

Conforme a legislação, os fermentados lácteos são definidos através da cultura ou dos microrganismos empregados na fermentação, e assim podem ser obtidos:

Iogurte – produto obtido pela fermentação realizada com o cultivo das bactérias *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, no qual pode ser acompanhado de outras bactérias para contribuição das características finais do produto (Figura 1);

Figura 1 - Iogurte.



Fonte: Depositphotos.com (2017).

Leite fermentado – produto obtido pela fermentação realizada por uma ou mais das seguintes cepas: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium* sp., *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e/ou outras bactérias para contribuição das características finais do produto (Figura 2);

Figura 2 – Leites fermentados.



Fonte: LMdiets (2017).

Leite acidófilo – produto obtido pela fermentação realizada exclusivamente com cepas de *Lactobacillus acidophilus* (Figura 3);

Figura 3 – Leite acidófilo.



Fonte: Allbiz (2017).

Kumys – produto obtido pela fermentação realizada por cepas de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Kluyveromyces marxianus* (Figura 4);

Figura 4 – Kumys.



Fonte: Sena et al. (2017).

Kefir – produto obtido pela fermentação realizada por cepas ácido-láticas elaboradas a partir dos grãos de Kefir, *Lactobacillus kefir*, espécies dos gêneros *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Acetobacter* com produção de ácido láctico, etanol e dióxido de carbono (Figura 5);

Figura 5 – Kefir.



Fonte: Ateliê de Blogs (2017).

Coalhada – produto obtido pela fermentação realizada por cepas individuais ou mistas de bactérias mesofílicas produtoras de ácido láctico (Figura 6);

Figura 6 – Coalhada.



Fonte: Ferreira (2017).

3.2 LEITES FERMENTADOS PROBIÓTICOS

A expressão probióticos tem origem grega, com significado “para a vida”. São micro-organismos vivos conhecidos pela capacidade benéfica à saúde quando administrados em quantidades adequadas, proporcionando melhoras no equilíbrio microbiano intestinal do hospedeiro que o consome (ANVISA, 2002; SANDERS, 2003). Sua capacidade para resistir ao suco gástrico ácido do estômago, aos sais biliares e às enzimas digestivas são as características mais importantes dos probióticos. Necessitam ser estáveis quando aplicados em alimentos, além da capacidade de aderir à mucosa intestinal e produzir substâncias que inibem o crescimento de bactérias indesejáveis (FAO/WHO, 2002).

O uso de probióticos é considerado propício para investimentos futuros em produtos com sua utilização, sendo estes junto com as bactérias tradicionais ou não, melhorando as características do produto tradicional com a presença de agentes “biotecnológicos”, buscando como exemplo reduzir a pós-acidificação do iogurte, fato comprovado pela ação de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium* ssp., ou como “agentes terapêuticos”, provocando ações benéficas nos indivíduos que os ingerem (ANTUNES, 2001).

Dentro da indústria de alimentos, o setor que mais investe na adição de probióticos é o de laticínios, com intuito de fornecer produtos com propriedades funcionais. Leites fermentados, iogurtes e bebidas lácteas contendo probióticos são os principais produtos comercializados no mundo com alegação de promover a saúde (CASTRO et al. 2013). Os lácteos e seus derivados são considerados meios de crescimentos efetivos para desenvolvimento das bactérias probióticas, pois neles estão contidos substratos indispensáveis para a fermentação, como exemplo dos açúcares e as proteínas (ORDOÑEZ et al., 2005; GAVA et al., 2008).

O ponto considerado chave em relação a um produto ser considerado probiótico se trata da manutenção das bactérias durante sua vida de prateleira. É essencial que as bactérias probióticas sobrevivam no produto alimentício, e estejam em populações elevadas. Ainda não é possível definir a quantidade exata que deve ser consumida dos probióticos para propiciar sua eficiência, pois esta quantidade varia segundo a característica de cada cepa, e da forma pela qual o produto foi elaborado. Sendo assim, alguns autores apontam como recomendada a dose diária de 100 g de produtos lácteos contendo aproximadamente 10^7 a 10^9 UFC g⁻¹ de microrganismos probióticos (VINDEROLA; RENHEIMER, 2000; SHAH, 2000). Pela

legislação brasileira, a dose diária recomendada para alimentos probióticos é de 10^8 a 10^9 UFC g⁻¹, ingeridos com objetivo de proporcionar efeitos funcionais (ANVISA, 2008).

3.2.1 Benefícios dos leites fermentados probióticos para a saúde

De acordo com Shah (2007), os conceitos e os benefícios para a saúde fornecidos pelos leites fermentados começaram a ser adotados no século XX. Atualmente, as culturas probióticas vêm sendo estudadas cada vez mais em busca dos seus benefícios nutricionais. Grande parte dos estudos está voltada para a ação conjunta dos lactobacilos e/ou bifidobactérias. Contudo, o caráter sensível dos microrganismos proporciona uma complexa tarefa para as fábricas de laticínios na elaboração de leites fermentados de alta qualidade com presença destes bioprodutos (OLIVEIRA, 2013).

Os probióticos possuem um mecanismo que por competição dos sítios de adesão formam uma barreira contra agentes patogênicos (LAZADO et al., 2011), onde a competição por nutrientes impede a colonização de outros microrganismos, além da inativação das toxinas e seus receptores (SILVA et al., 2004), como também a produção de substâncias antibacterianas com ação bacteriostática ou bactericida quando relacionado às bactérias patogênicas (LIMA et al., 2007). Os lactobacilos e bifidobactérias, ao estarem presentes no intestino, podem auxiliar na prevenção de doenças, dentre elas as relacionadas com o trato gastrointestinal (ISOLAURI et al., 2004). Também favorecem na modulação das características fisiológicas do trato gastrointestinal, atuando na imunidade da mucosa e na permeabilidade intestinal (BRANDT et al., 2006; SAAD, 2006).

O intestino é formado por uma membrana que o reveste, sendo ela protegida por um sistema imunológico adaptativo. Com o uso contínuo dos leites fermentados, existe a possibilidade de reconstruir a microbiota intestinal, isso com o aumento da barreira imunológica local. Assim, as inflamações, com o passar do tempo, são amenizadas (SAAD, 2006; PIMENTEL; BARBALHO, 2007). Estudos realizados por Wang et al. (2004) avaliaram o uso de leites fermentados com e sem *Lactobacillus paracasei* em crianças com rinite alérgica perene, onde 80 crianças participaram do teste por 30 dias. Aquelas que consumiram o leite fermentado com *Lactobacillus paracasei* apresentaram melhoras significativas, o que comprova que a suplementação com este microrganismo é segura, melhorando a qualidade de vida daqueles que o consomem.

Os leites fermentados quando avaliados em relação à intolerância à lactose, manifestada no indivíduo por conta falta da enzima β -galactosidase no intestino, apresentam

vantagem no fato das bactérias, como *Lactobacillus acidophilus*, serem capazes de produzir a enzima que possibilita a quebra das moléculas de lactose presente no leite, favorecendo a sua digestão (SAAD, 2006; THAMER; PENNA, 2006; WARD et al., 2006; SHAH, 2007).

3.2.2 Microrganismos utilizados na elaboração de leites fermentados probióticos

Na elaboração de leites fermentados, na maioria das vezes, se utiliza culturas *starter*, isto pelo fato de possuírem rápida atividade metabólica, proporcionando uma acelerada redução do pH do leite, impossibilitando o crescimento de microrganismos que possivelmente seriam responsáveis por uma competição (TAMIME, 2006). A tendência é utilizar os fermentos que contenham as cepas de *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium*. A aplicação destas bactérias em simbiose é justificada com o intuito de fornecer ao produto final melhores características (OLIVEIRA, 2013).

Streptococcus thermophilus

A *Streptococcus thermophilus* é utilizada com a função de cultura *starter* nos fermentados lácteos. Frequentemente ocorre a associação da *Streptococcus thermophilus* com uma ou várias espécies dentre as quais se encontra os *Lactobacillus* (OLIVEIRA, 2013). A temperatura ideal para o desenvolvimento da *Streptococcus thermophilus* se encontra entre 40 e 45 °C para obtenção de um ótimo crescimento, com sua capacidade limitada de fermentar açúcares, entre eles a lactose, sacarose, glicose e frutose (TAMIME, 2006).

Na utilização de *Streptococcus thermophilus*, um fator importante atribuído aos produtos lácteos durante o momento de fermentação é a produção de exopolissacarídeo (EPS), responsável por auxiliar na textura final da maioria dos leites fermentados. As cepas capazes de produzir EPS são utilizadas em processos com objetivo de substituir a gordura de produtos desnatados, para assim conseguir manter a viscosidade aproximada em relação a leites fermentados integrais. No entanto, a produção de EPS é dependente da temperatura de incubação do leite, como também da cepa utilizada (VUYST et al., 2003; PURWANDARI et al., 2007).

Lactobacillus acidophilus

As cepas do gênero *Lactobacillus* possuem um grande número de espécies, e apresentam variadas propriedades bioquímicas e fisiológicas. São bactérias caracterizadas em sua maioria como gram-positivas, e o seu desenvolvimento pode ser em ambientes aeróbios

ou anaeróbios. Possuem a capacidade de crescer em temperaturas entre 30 e 40 °C, com pH ótimo entre 5,5 e 6,2 quando utilizada sem a presença de outras culturas. Estudos indicam que são conhecidas cerca de 56 espécies do gênero *Lactobacillus*, sendo que a mais estudada é a *Lactobacillus acidophilus*, e também é considerada a mais utilizada (O'SULLIVAN, 2006).

Estudos comprovam que a linhagem de *Lactobacillus acidophilus* cumpre a função de microrganismo probiótico, possui a capacidade de melhorar a funcionalidade dos produtos aos quais for adicionada, por dispor da capacidade de sintetizar o ácido fólico, niacina, riboflavina, e vitamina k. Ainda consegue modular a microbiota intestinal, reforçar o sistema imune, auxiliar no tratamento contra infecções intestinais (SAZAWAL et al., 2006; SAARELA et al., 2000), e diminuir o risco de carcinogenicidade por ser capaz de reduzir os níveis de enzimas responsáveis por ativar os pró-carcinógenos (RAFTER, 2002).

Bifidobacterium

A aplicação da *Bifidobacterium* para elaboração de leites fermentados é considerada limitada, pois possui um lento crescimento. A temperatura indicada como satisfatória para o crescimento da *Bifidobacterium* está entre 37 e 42 °C, e o pH ótimo entre 4,8 e 5,5. Mesmo sabendo que o leite é um meio indicado para o desenvolvimento deste microrganismo por conter nutrientes essenciais, aminoácidos e pequenos peptídeos, estes nutrientes estão presentes em pequenas quantidades, sendo assim insuficientes para o crescimento desejado da *Bifidobacterium* (OLIVEIRA, 2013).

A *Bifidobacterium*, em meios sintéticos, apresenta melhor desenvolvimento do que quando presente no leite. Apesar disso, a obtenção destes meios para multiplicação é desfavorecida pelo seu elevado custo, como também por proporcionarem sabores desagradáveis ao produto. Com isso, melhores condições de multiplicação podem ser obtidas pelo uso de diferentes linhagens de *Bifidobacterium* aplicadas ao leite, escolha de linhagens com menor necessidade de consumo de nutrientes para sua sobrevivência, juntamente com o controle do pH final (OLIVEIRA, 2013).

3.3 ANTIOXIDANTES NATURAIS E OS COPRODUTOS DA VINIFICAÇÃO

Na busca por uma dieta mais saudável, o consumo de alimentos ricos em propriedades antioxidantes é um dos caminhos mais indicados para obtenção de bons resultados. As formulações de fermentados lácteos com propriedades antioxidantes são indicadas com potencial para serem utilizadas como produtos funcionais (MUNIANDY et al., 2016). Os

antioxidantes em alimentos possuem essas características pela presença de componentes como os flavonoides e carotenoides, como também as vitaminas C e E, de forma que a sua importância pode ser justificada pela sua atuação na desativação de radicais livres. Eles apresentam vários mecanismos de ação, sendo representados por qualquer substância que, quando comparada ao seu extrato oxidável, esteja presente em baixas concentrações e atue inibindo ou retardando eficientemente a oxidação deste substrato oxidável (CHEUCZUK et al., 2014).

Dentre os compostos químicos naturais que mais se destacam pela sua ação antioxidante estão os compostos fenólicos, que são amplamente distribuídos no reino vegetal. As frutas e os vegetais contêm uma grande variedade destes compostos, sendo também boas fontes dietéticas. Estes dispõem em sua composição de variadas quantidades e qualidades destes constituintes, com grande influência na redução do risco de certas doenças as quais muitas delas estão relacionadas à presença de radicais livres (CHEUCZUK et al., 2014).

Os compostos fenólicos são amplamente encontrados na uva e nos produtos derivados da uva, como os vinhos. Além disso, estes compostos são encontrados nos coprodutos da vinificação, como as cascas e sementes de uva. Em relação aos coprodutos da vinificação, estes são originados principalmente da prensagem das matérias-primas da vinificação constituídas pelas partes sólidas das uvas e pelo mosto, ou pelo conjunto mosto/vinho que as embebe. O bagaço, como “resíduo” da prensagem, representa de 12 a 15% em peso da matéria-prima inicial, contendo na sua composição frações de açúcares e outros glicídeos, proteínas e, nas sementes, um elevado teor de lipídeos (SILVA, 2003). Os compostos fenólicos presentes nas uvas passam para o vinho, em maior ou menor intensidade, dependendo das características do processo de vinificação. Mas, independentemente desta transferência, e considerando que a maior parte destes compostos é encontrada nas partes sólidas da uva, uma grande proporção permanece nos coprodutos da vinificação (ALONSO et al., 2002). Os compostos fenólicos estão presentes principalmente nas cascas e nas sementes da uva, com quantidades bem menores na polpa. Os flavonóis são os compostos mais abundantes nas cascas, enquanto que as sementes são ricas em flavan-3-ols (MONTEALEGRE et al., 2006).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

Os ingredientes básicos utilizados na formulação dos leites fermentados (açúcar e leite UHT - "Ultra-High Temperature", temperatura ultra alta) foram adquiridos no comércio local da cidade de João Pessoa-PB. Uma mistura pronta para aroma e sabor de uva foi adquirida através de comércio eletrônico, contendo os seguintes ingredientes: sacarose, amido modificado, aroma natural reforçado de uva. Também através de comércio eletrônico foram adquiridas de um fornecedor certificado as farinhas de semente e de casca de uva orgânica e desengordurada utilizadas neste trabalho. Cultura liofilizada probiótica das cepas *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium* foram adquiridas da empresa Sacco Brasil (Campinas, SP) com a descrição Lyofast SAB 440 A. Todo o trabalho foi desenvolvido nos laboratórios do Centro de Tecnologia e Desenvolvimento Regional da Universidade Federal da Paraíba.

4.2 PREPARO E SELEÇÃO DO INÓCULO

Para a definição do preparo do inóculo, foram realizados testes em busca de se obter um crescimento probiótico acima do mínimo exigido pela legislação, que é de $6 \log$ UFC/g do probiótico no produto final (BRASIL, 2007).

Nos primeiros testes, a cultura probiótica liofilizada foi dissolvida nas proporções de 0,25 g para 25 mL de leite e, posteriormente, 0,1 g para 100 mL de leite, e, em ambos os casos, mantida em incubação a 37 °C por tempos de 3, 6 e 12 h. Em seguida, estes inóculos foram testados em meio de cultura MRS simples, sem adição de outros componentes, e também testados em meio de cultura MRS modificado acrescido de propionato de sódio (0,3% m/v), cloreto de lítio (0,2% m/v) e L-cisteína HCL (0,05% m/v). Os meios foram mantidos em anaerobiose a 37 °C (Anaerobac sistema anaeróbio, PROBAC, Santa Cecília, SP) por 72 h conforme descrito por Silveira (2014).

No terceiro teste, utilizou-se também a proporção de 0,1 g de cultura em 100 mL de leite no preparo do inóculo com os meios MRS simples e MRS modificado, porém alterou-se a composição do meio de cultura MRS modificado pela retirada do propionato de sódio e do cloreto de lítio, mantendo-se a L-cisteína HCL, porém reduzindo-se sua concentração de 0,05% para 0,04% (m/v). Com isso, o meio MRS modificado passou a ser designado como

MRS cisteína. A alteração da composição do meio de cultura MRS modificado tinha como objetivo proporcionar o crescimento tanto do *Lactobacillus acidophilus* quanto do *Bifidobacterium* no inóculo, uma vez que este último microrganismo foi considerado sensível à presença dos componentes originais do meio de cultura MRS modificado.

No quarto teste, a cultura foi adicionada diretamente ao leite para elaboração do fermentado lácteo, sem o preparo de um inóculo, com a expectativa de que a cultura probiótica pudesse ser favorecida pelos nutrientes presentes nos ingredientes utilizados na formulação do produto, além dos nutrientes naturalmente presentes no leite utilizado. Utilizou-se para isso 0,5 g da cultura probiótica para 1 L de leite. A fermentação foi conduzida a 42 ± 2 °C até obtenção de pH 4,8.

Como não houve crescimento de bactérias probióticas no produto elaborado no quarto teste, foi realizado o quinto teste, no qual o preparo de um inóculo foi retomado, sendo este obtido pela dissolução inicial de 5,0 g da cultura liofilizada para 500 mL de leite, do qual foi retirada uma alíquota de 40 mL de inóculo para a elaboração de 1 L de leite fermentado. Cabe ressaltar que, neste teste, a massa de cultura liofilizada utilizada (5 g) correspondia ao conteúdo total de um envelope obtido do fornecedor, eliminando a possibilidade de desproporção entre as cepas devido à pesagem. Antes da adição do inóculo, os ingredientes sólidos foram adicionados ao leite e procedeu-se a homogeneização e pasteurização. Após resfriamento e adição do inóculo, a mistura foi mantida a 42 ± 2 °C até obtenção de pH 4,8.

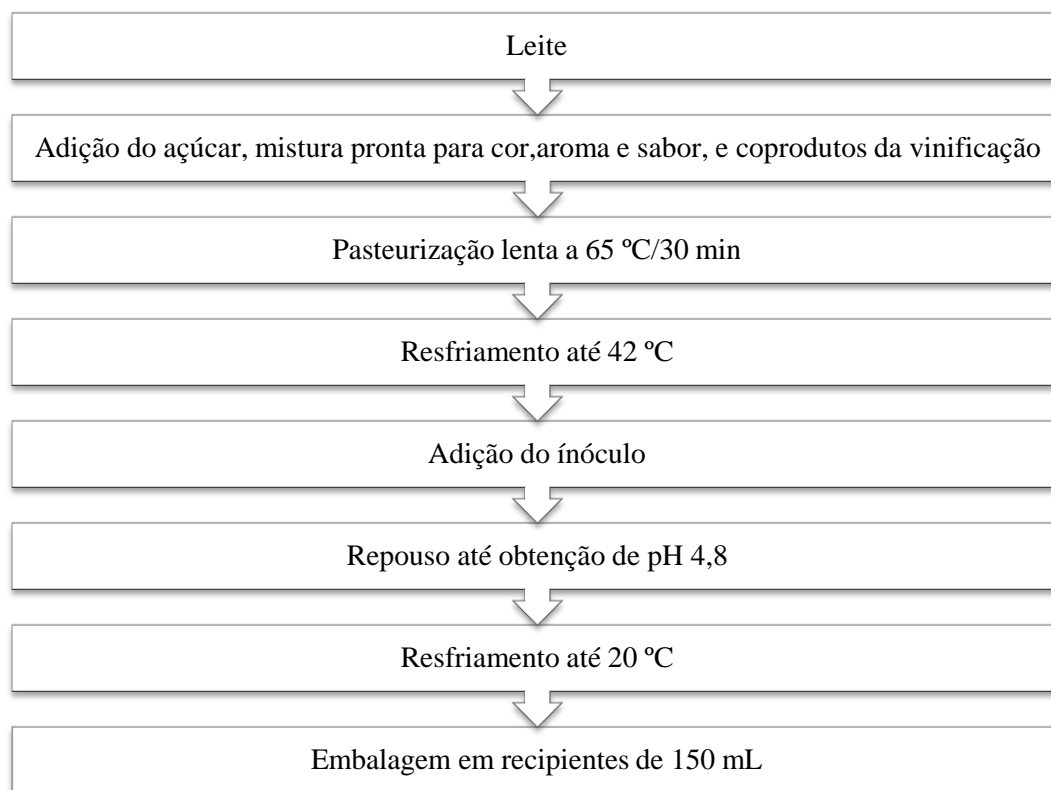
4.3 ELABORAÇÃO DOS LEITES FERMENTADOS

Para a elaboração dos leites fermentados foram executadas as etapas (Figura 7) previstas na legislação vigente (BRASIL, 2007), de forma que:

1. Os ingredientes sólidos (açúcar, mistura pronta para cor, aroma e sabor, e os coprodutos da vinificação – farinha de semente e casca de uva) foram separadamente pesados, sendo os coprodutos da vinificação utilizados nas concentrações de 1 e 3% (m/v, em relação aos produtos finais), além de um tratamento Controle, sem adição de coprodutos (Tabela 1);
2. Os ingredientes foram adicionados ao leite, homogeneizados e em seguida pasteurizados a 65 ± 2 °C por 30 min, sendo resfriados em banho de água com gelo até 42 ± 2 °C;
3. O inóculo foi adicionado à mistura na proporção de 40 mL para 1000 mL de produto final, homogeneizando-se a mistura;
4. A mistura foi mantida em banho-maria a 42 ± 2 °C por 5 h até obtenção de pH 4,8 no produto, indicando o fim do processo fermentativo;

5. O produto foi resfriado até 20 ± 2 °C e acondicionado em garrafas de polipropileno de 150 mL previamente higienizadas, sendo então armazenado a 5 ± 2 °C até as análises.

Figura 7 - Fluxograma do processamento dos leites fermentados.



Fonte: Próprio autor.

Tabela 1 – Formulação final dos leites fermentados.

Ingrediente	Controle	Semente 1%	Semente 3%	Casca 1%	Casca 3%
Leite (mL)	900	890	870	890	870
Açúcar (g)	100	100	100	100	100
Inóculo (mL)	40	40	40	40	40
Farinha de semente de uva (g)	-	10	30	-	-
Farinha de casca de uva (g)	-	-	-	10	30
Mistura pronta para cor, aroma e sabor (g)	5	5	5	5	5

Controle – isenta da farinha da semente de uva e isenta da farinha da casca de uva; Semente 1% - adição de 1% da farinha de semente de uva; Semente 3% - adição de 3% da farinha de semente de uva; Casca 1% - adição de 1% da farinha de casca de uva; Casca 3% - adição de 3% da farinha de casca de uva.

4.4 DETERMINAÇÕES MICROBIOLÓGICAS NOS LEITES FERMENTADOS

Para a análise da viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium* nos leites fermentados no dia seguinte à elaboração dos produtos, porções de 25 mL foram colhidas assepticamente, diluídas em 225 mL de água peptonada (diluição 10^{-1}) e submetidas a diluições decimais seriadas com o mesmo diluente. *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium* foram enumerados utilizando semeadura em profundidade em ágar DeMan-Rogosa-Sharpe (MRS Agar, Himedia, Índia) acrescido de L-cisteína HCL (0,04% m/v), em anaerobiose a 37 °C (Anaerocult, gerador de anaerobiose, MERCK) por 72 h conforme descrito por Silveira (2014), com modificações. Os resultados foram expressos em logaritmo de unidades formadoras de colônias por mL (log UFC/mL).

Para avaliar a qualidade dos leites fermentados sob o aspecto microbiológico, foram realizadas de acordo com metodologia recomendada pela Instrução Normativa N° 46 (BRASIL, 2007), as seguintes análises microbiológicas: determinação do Número Mais Provável (NMP/mL) de coliformes totais e termotolerantes; e contagem de bolores e leveduras em placas empregando ágar batata-dextrose (PDA) acidificado.

4.5 DETERMINAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS NOS LEITES FERMENTADOS

Para a avaliação físico-química dos leites fermentados, foram realizadas as seguintes determinações: extrato seco total (IAL 429/IV), teor de lipídeos pelo método de Gerber (IAL 433/IV), teor de cinzas (IAL 437/IV), teor de lactose pelo método de Fehling (IAL 432/IV), além das determinações de pH (IAL 017/IV) e acidez titulável (IAL 493/IV). Todas as análises foram realizadas em triplicata e seguindo as recomendações do Instituto Adolfo Lutz (2008).

4.6 ELABORAÇÃO DE EXTRATOS

Para a avaliação do conteúdo fenólico e atividade antioxidante, foram obtidos extratos etanólicos a partir dos fermentados lácteos. Para isso, foram pesados 20,00 g de cada leite fermentado em erlenmeyer de 125 mL, adicionados 10 mL de álcool etílico absoluto, e homogeneizado com agitador magnético por 15 min. Em seguida, os extratos foram centrifugados (5000 rpm, 10 min) e o sobrenadante límpido recolhido e analisado quanto ao conteúdo fenólico e atividade antioxidante.

4.7 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO FENÓLICO TOTAL

O conteúdo de compostos fenólicos totais foi determinado espectrofotometricamente de acordo com o método de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ROSSI, 1965), com a leitura da absorbância em 765 nm. A concentração de fenólicos totais foi medida após 2 h de repouso da mistura e seu valor comparado com o do padrão de ácido gálico. Os resultados foram expressos em mg equivalente a ácido gálico (GAE)/mL.

4.8 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Para a avaliação da atividade antioxidante foi utilizada a metodologia descrita por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995). A queda na absorbância da solução do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila, 100 μ M, 2,9 mL) dissolvido em metanol a 80% foi monitorada a 515 nm, 30 min após a adição de cada extrato. Os resultados foram expressos em μ mol de Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC)/mL.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises foram conduzidas em triplicata e os dados expressos como média \pm desvio padrão (DP). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) ao nível de 5% de significância, seguida pelo teste de Tukey para comparação das médias utilizando-se o software Statistica® versão 10.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 TESTES COM O INÓCULO

Inicialmente é importante destacar que no desenvolvimento deste trabalho foram realizados vários testes para a definição de um inóculo que apresentasse viabilidade celular satisfatória para atuação como probiótico nos leites fermentados, o que demandou a maior parte do tempo e assim impossibilitou a caracterização completa do produto final obtido. Neste contexto, optou-se por descrever em detalhes os testes realizados e os resultados obtidos nesta etapa.

Os resultados obtidos no primeiro teste são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Contagens (UFC¹/mL) de viabilidade celular probiótica no primeiro e segundo teste para definição de inóculo.

Tempo de incubação (h)	pH	0,25 g de cultura em 25 mL de leite		0,1 g de cultura em 100 mL de leite	
		MRS simples (anaerobiose)	MRS modificado (anaerobiose)	MRS simples (anaerobiose)	MRS modificado (anaerobiose)
3	5,1	$1,3 \times 10^5$	$< 10^5$	-	$< 10^5$
6	5,0	$5,0 \times 10^7$	$< 10^5$	$1,9 \times 10^7$	$< 10^5$
12	4,3	$1,8 \times 10^8$	$< 10^5$	$1,1 \times 10^8$	$< 10^5$

¹UFC = Unidades Formadoras de Colônia.

De acordo com as contagens obtidas, observou-se que no primeiro teste utilizando-se a proporção de 0,25 g de cultura em 25 mL de leite, o tempo de incubação de 3 h não foi suficiente para o desenvolvimento das bactérias probióticas ao nível desejado para utilização como inóculo na elaboração dos leites fermentados. Nos tempos de 6 e 12 h de incubação foram obtidas contagens acima do mínimo exigido pela legislação para probióticos ao se utilizar o meio de cultura MRS simples em anaerobiose, porém levou-se em consideração que estas contagens seriam reduzidas para valores abaixo do exigido pela legislação, ou seja, 10^6 UFC/mL, ao serem dissolvidas na quantidade de leite a ser utilizado no preparo dos leites fermentados. Já para o meio de cultura MRS modificado, não foi observado crescimento. Dessa forma, foram necessários novos testes.

No segundo teste realizado utilizando-se a proporção de 0,1 g de cultura em 100 mL de leite, o meio de cultura MRS modificado também não apresentou crescimento, enquanto que no meio de cultura MRS simples o crescimento obtido também não seria suficiente para a

manutenção de contagens mínimas exigidas para um produto probiótico após dissolução no leite para elaboração dos fermentados lácteos.

Os resultados obtidos no terceiro teste são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Contagens (UFC¹/mL) de viabilidade celular probiótica no terceiro teste para definição de inóculo.

Tempo de incubação (h)	pH	MRS simples (anaerobiose)	MRS cisteína (anaerobiose)
6	4,7	$1,1 \times 10^7$	$2,5 \times 10^7$
12	4,1	$2,0 \times 10^8$	$8,0 \times 10^7$

¹UFC = Unidades Formadoras de Colônia.

Os dados obtidos mostram que houve crescimento bacteriano no meio MRS cisteína, o que permitiria sua utilização para a avaliação da viabilidade do inóculo, porém este crescimento não atingiu o nível desejado para utilização na elaboração dos leites fermentados.

No quarto teste, com o intuito de avaliar o crescimento de bactérias lácticas nos fermentados elaborados com adição direta da cultura liofilizada, o meio de cultura MRS simples foi utilizado em aerobiose, e para a avaliação da viabilidade dos probióticos foi utilizado o meio MRS cisteína, já que o MRS modificado não apresentou crescimento nos testes anteriores. Os resultados obtidos no quarto teste são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Contagens (UFC¹/mL) de viabilidade celular no quarto teste para elaboração de fermentados lácteos.

Amostra	pH	Bactérias lácticas em MRS simples (aerobiose)	MRS cisteína (anaerobiose)
Controle	4,8	$7,7 \times 10^5$	$< 10^4$
Semente 1%	4,9	$5,4 \times 10^6$	$< 10^4$
Semente 3%	4,9	$6,6 \times 10^5$	$< 10^4$
Casca 1%	4,8	$5,1 \times 10^6$	$< 10^4$
Casca 3%	4,9	$5,0 \times 10^6$	$< 10^4$

¹UFC = Unidades Formadoras de Colônia. Controle – isenta da farinha da semente de uva e isenta da farinha da casca de uva; Semente 1% - adição de 1% da farinha de semente de uva; Semente 3% - adição de 3% da farinha de semente de uva; Casca 1% - adição de 1% da farinha de casca de uva; Casca 3% - adição de 3% da farinha de casca de uva.

De acordo com os resultados obtidos no quarto teste, a contagem das bactérias em aerobiose realizada no meio de cultura MRS simples comprovou o crescimento da cepa *Streptococcus thermophilus*, sendo ela uma das principais atuantes no desenvolvimento dos leites fermentados pela sua grande influência no pH final observado no produto. As amostras apresentaram um crescimento bacteriano entre 10^5 e 10^6 UFC/mL, considerado satisfatório, já

que o uso desta cepa dentro da cultura mista tem a função de acelerar a redução do pH durante a fermentação. No entanto, a aplicação direta da cultura mista na mistura do leite com os ingredientes não favoreceu o crescimento satisfatório das bactérias probióticas, uma vez que o meio de cultura MRS cisteína não apresentou crescimento.

Os resultados obtidos no quinto teste são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Contagens (UFC¹/mL) de viabilidade celular no quinto teste para elaboração de fermentados lácteos.

Amostra	pH	Bactérias lácticas em MRS simples (aerobiose)	MRS cisteína (anaerobiose)
Controle	4,8	$6,7 \times 10^5$	$5,7 \times 10^8$
Semente 1%	4,9	$1,0 \times 10^7$	$5,9 \times 10^8$
Semente 3%	4,8	$2,9 \times 10^5$	$4,1 \times 10^8$
Casca 1%	5,0	$6,0 \times 10^6$	$4,7 \times 10^8$
Casca 3%	4,9	$1,1 \times 10^5$	$3,8 \times 10^8$

¹UFC = Unidades Formadoras de Colônia. Controle – isenta da farinha da semente de uva e isenta da farinha da casca de uva; Semente 1% - adição de 1% da farinha de semente de uva; Semente 3% - adição de 3% da farinha de semente de uva; Casca 1% - adição de 1% da farinha de casca de uva; Casca 3% - adição de 3% da farinha de casca de uva.

As contagens realizadas no quinto teste em meio MRS cisteína mostraram um crescimento das bactérias que permite classificar estes produtos como probióticos, por apresentarem contagens acima do exigido pela legislação. Estes produtos foram então avaliados quanto aos parâmetros microbiológicos de qualidade, características físico-químicas e atividade antioxidante.

5.2 QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DOS LEITES FERMENTADOS PROBIÓTICOS

Os resultados da avaliação microbiológica dos leites fermentados probióticos são apresentados na Tabela 6.

De acordo com os resultados, os produtos elaborados neste trabalho estão dentro do padrão microbiológico preconizado pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados, estabelecido na Instrução Normativa N° 46, de 23 de outubro de 2007 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2007), estando aptos para o consumo.

Tabela 6 – Parâmetros microbiológicos de qualidade dos leites fermentados probióticos.

Amostra	Coliformes totais (NMP ¹ /mL)	Coliformes termotolerantes (NMP ¹ /mL)	Bolores e leveduras (UFC ² /mL)
Controle	< 3,0	< 3,0	< 10 ²
Semente 1%	< 3,0	< 3,0	< 10 ²
Semente 3%	< 3,0	< 3,0	< 10 ²
Casca 1%	< 3,0	< 3,0	< 10 ²
Casca 3%	< 3,0	< 3,0	< 10 ²

¹NMP = Número Mais Provável. ²UFC = Unidades Formadoras de Colônia. Controle – isenta da farinha da semente de uva e isenta da farinha da casca de uva; Semente 1% - adição de 1% da farinha de semente de uva; Semente 3% - adição de 3% da farinha de semente de uva; Casca 1% - adição de 1% da farinha de casca de uva; Casca 3% - adição de 3% da farinha de casca de uva.

5.3 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DOS LEITES FERMENTADOS PROBIÓTICOS

Os leites fermentados probióticos foram avaliados quanto a características físico-químicas e os resultados são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Características físico-químicas dos leites fermentados probióticos.

Amostra	pH	Acidez (%)	Extrato Seco (%)	Lactose (%)	Gordura (%)	Cinzas (%)
Controle	4,79 ± 0,03 a	0,61 ± 0,02 bc	19,85 ± 1,35 b	3,36 ± 0,06 a	2,84 ± 0,07 a	0,71 ± 0,03 b
Semente 1%	4,83 ± 0,04 a	0,74 ± 0,03 a	21,18 ± 0,65 ab	3,11 ± 0,32 a	2,77 ± 0,12 a	0,82 ± 0,06 b
Semente 3%	4,84 ± 0,05 a	0,60 ± 0,02 c	23,09 ± 0,53 a	2,94 ± 0,19 a	2,67 ± 0,06 a	0,96 ± 0,04 a
Casca 1%	4,88 ± 0,11 a	0,71 ± 0,02 a	20,98 ± 1,01 ab	3,17 ± 0,33 a	2,80 ± 0,10 a	0,80 ± 0,06 b
Casca 3%	4,90 ± 0,09 a	0,69 ± 0,07 ab	22,76 ± 0,69 a	3,05 ± 0,19 a	2,73 ± 0,15 a	0,84 ± 0,05 ab

Valores expressos como média ± desvio padrão (n = 3). Letras diferentes na mesma coluna representam diferença estatisticamente significativa (p < 0,05). Controle – isenta da farinha da semente de uva e isenta da farinha da casca de uva; Semente 1% - adição de 1% da farinha de semente de uva; Semente 3% - adição de 3% da farinha de semente de uva; Casca 1% - adição de 1% da farinha de casca de uva; Casca 3% - adição de 3% da farinha de casca de uva.

Quanto ao pH, o valor obtido correspondente à amostra Controle foi utilizado como referência para o final do processo fermentativo, tendo transcorrido o tempo de 5 h de fermentação. Assim, subsequentemente, as demais amostras também foram mantidas em fermentação durante 5 h. Este referencial de pH final da fermentação foi estabelecido com base nas características da cultura mista empregada. No estudo realizado por Zacarchenco e Massaguer-Roig (2004), ao se utilizar cepas de *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium*

longum e *Lactobacillus acidophilus* na elaboração de um leite fermentado, obteve-se pH final de 4,88, semelhante aos valores obtidos no presente trabalho.

Os valores de acidez apresentaram variação significativa entre as diferentes amostras, com valor máximo de 0,74% para o leite fermentado adicionado de 1% de farinha de semente de uva. As variações no teor de acidez, contudo, não puderam ser associadas às concentrações dos coprodutos da vinificação utilizadas na elaboração dos leites fermentados. Ainda assim, todas as amostras estavam de acordo com a Instrução Normativa N° 46 (BRASIL, 2007) que preconiza que os limites máximo e mínimo estejam entre 0,6 e 2,0% em ácido láctico.

Os teores de extrato seco nos leites fermentados apresentaram uma pequena variação significativa entre as amostras, com aumento no valor associado ao aumento no teor dos coprodutos utilizados na formulação. Os valores obtidos no presente trabalho foram semelhantes aos resultados apresentados por Gallina e colaboradores (2011), que obtiveram teores de extrato seco entre 20,43 e 21,07% na avaliação de leites fermentados com e sem adição de probióticos e prebióticos.

Para os teores de lactose nos leites fermentados, não foram observadas diferenças significativas, tendo sido obtidos os menores valores nas amostras adicionadas de 3% de coprodutos da vinificação na formulação. Os valores estão de acordo com o trabalho de Longo (2006), que obteve valor médio de 3,69% de lactose, e que ressalta a redução nos teores de lactose observados em leites fermentados quando comparados com os teores originais observados no leite.

Quanto aos teores de gordura nos leites fermentados, também não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos. O valor médio obtido foi de 2,76%, muito semelhante aos valores médios relatados no trabalho de Gallina e colaboradores (2011), os quais obtiveram média de 2,80% de gordura em leites fermentados de diferentes tratamentos.

Já para os teores de cinzas, houve variação significativa nos valores obtidos. O leite fermentado elaborado com adição de 3% de farinha de semente de uva apresentou o maior teor de cinzas, 0,96%. A adição de coprodutos da vinificação resultou em aumento nos teores de cinzas tanto para os tratamentos com farinha de semente quanto para aqueles com farinha de casca de uva. O teor de cinzas obtido para a amostra Controle, 0,71%, é muito semelhante aos valores descritos por Antunes e colaboradores (2004) para diferentes lotes de leite empregados no preparo de iogurtes, os quais variaram de 0,70 a 0,74%.

5.4 CONTEÚDO FENÓLICO TOTAL E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE NOS LEITES FERMENTADOS PROBIÓTICOS

Os teores de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante *in vitro* foram avaliados nos extratos obtidos das diferentes formulações de leites fermentados com a finalidade de verificar o incremento das propriedades antioxidantes nos produtos finais a partir da incorporação dos ingredientes funcionais da casca e da semente de uva, reconhecidas fontes de compostos fenólicos antioxidantes. Os resultados são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 – Conteúdo fenólico total e atividade antioxidante dos leites fermentados probióticos elaborados com adição de farinha de semente e farinha de casca de uva.

Amostra	Fenólicos Totais (mg GAE ¹ /100 g)	DPPH (uMol TEAC ² /100 g)
Controle	3,31 ± 0,25 e	4,85 ± 0,76 d
Semente 1%	19,78 ± 0,34 c	29,05 ± 0,51 b
Semente 3%	47,53 ± 0,62 a	45,30 ± 1,38 a
Casca 1%	11,01 ± 0,36 d	15,99 ± 1,25 c
Casca 3%	23,60 ± 1,12 b	28,76 ± 0,44 b

Valores expressos como média ± desvio padrão (n = 3). Letras diferentes na mesma coluna representam diferença estatisticamente significativa (p < 0,05). ¹GAE = Gallic Acid Equivalent. ²TEAC = Trolox Equivalent Antioxidant Capacity. Controle – isenta da farinha da semente de uva e isenta da farinha da casca de uva; Semente 1% - adição de 1% da farinha de semente de uva; Semente 3% - adição de 3% da farinha de semente de uva; Casca 1% - adição de 1% da farinha de casca de uva; Casca 3% - adição de 3% da farinha de casca de uva.

O teor de compostos fenólicos totais variou significativamente entre os diferentes tratamentos, com os maiores valores sendo obtidos para os fermentados lácteos adicionados de 3% de farinha de semente e de 3% de farinha de casca de uva. A farinha de semente de uva possui maior teor fenólico quando comparada com a farinha de casca de uva, o que está de acordo com os estudos de Rockenbach e colaboradores (2011).

A atividade antioxidante medida pela desativação de radicais livres do DPPH apresentou correlação com o conteúdo fenólico presente nos diferentes extratos obtidos a partir dos fermentados lácteos, exceto no caso da amostra adicionada de 3% de farinha de casca de uva, a qual foi superada pela atividade antioxidante obtida na amostra com adição de 1% de farinha de semente, o que pode ser justificado pela natureza dos compostos fenólicos presentes majoritariamente em cada fração da uva, uma vez que a semente, segundo Rockenbach e colaboradores (2011), é composta por polímeros de catequina de elevada atividade antioxidante, presentes em concentrações bem superiores àsquelas encontradas na casca.

6 CONCLUSÃO

Para o desenvolvimento de leites fermentados utilizando uma cultura mista probiótica foi empregado um inóculo que favoreceu o crescimento das bactérias lácticas em níveis superiores ao mínimo exigido pela legislação. A adição de farinha de semente de uva e farinha de casca de uva não interferiu de forma significativa no processo fermentativo nas concentrações aplicadas. O emprego destes ingredientes funcionais resultou em expressivo aumento no conteúdo fenólico total e na atividade antioxidante dos produtos fermentados, especialmente no caso da farinha de semente de uva.

A utilização dos coprodutos da vinificação como ingredientes funcionais na elaboração de produtos lácteos resulta também em agregação de valor aos excedentes industriais da produção vinícola, com redução nos impactos ambientais decorrentes do alternativo despejo desta biomassa no ambiente quando não aproveitada.

Sugere-se que novos trabalhos sejam desenvolvidos para a otimização das concentrações de inóculo e dos ingredientes, bem como avaliação da vida-de-prateleira dos fermentados lácteos probióticos e de suas características sensoriais.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução de Diretoria Colegiada - RDC nº 02, de 07 de janeiro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcionais e/ou de Saúde. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 09 jan. 2002.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probiótico**. Diário Oficial da União, 2008. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm>. Acesso em: 02 junho 2017.

ALLBIZ. **Imagem de leites acidófilos**. Disponível em: <<http://www.pl.all.biz/pt/leite-acidilo-bgg1090882>> Acesso em: 18 maio 2017.

ALONSO, A. M.; GUILLÉN, D. A.; BARROSO, C. G.; PUERTAS, B.; GARCÍA, A. Determination of antioxidant activity of wine by-products and its correlation with polyphenolic content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 5832-5836, 2002.

ANTUNES, A. E. C.; CAZETTO, T. F.; CARDELLO, H. M. A. B. Iogurtes desnatados probióticos adicionados de concentrado protéico do soro de leite: perfil de textura, sinerese e análise sensorial. **Alimentos e Nutrição**, v. 15, p. 105-114, 2004.

ANTUNES, L. A. F. Microrganismos probióticos e alimentos funcionais. **Revista Indústria de Laticínios**, v. 6, n. 34, p. 30-34, 2001.

ARAÚJO, E. A. **Desenvolvimento e caracterização de queijo tipo Cottage adicionado de *Lactobacillus delbreuckii* UFV H2b20 e de inulina**. 2007. 67 p. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2007.

Ateliê de Blogs. **Imagem de kefir**. Kéfir de leite. 10 Outubro 2013. Disponível em: <<https://kefirdeleite.wordpress.com/2013/10/10/galeria-de-imagens/>> Acesso em: 18 maio 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007. **Regulamento de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados**. Brasília: Diário Oficial da União, 2007.

BRANDÃO, S. C. C. Novas gerações de produtos lácteos funcionais. **Indústria de Laticínios**, São Paulo, v. 6, n. 37, p. 64-66, 2002.

BRANDT, K.; SAMPAIO, M. M. S. C.; MIUKI, C. J. Importância da microflora intestinal: revisões e ensaios. **Revista Brasileira de Pediatria**, São Paulo, v. 28, n. 2, p. 117-127, 2006.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT – Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

CASTRO, W. F.; CRUZ, A. G.; BISINOTTO, M. S.; GUERREIRO, L. M. R.; FARIA, J. A. F.; BOLINI, H. M. A.; et al. Development of probiotic dairy beverages: Rheological properties and application of mathematical models in sensory evaluation. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 1, p. 16–25, 2013.

CHEUCZUK, F.; ROCHA, L. A. **Propriedades antioxidantes de bebida láctea fermentada prebiótica incorporada de polpa de cajá-manga**. 2014. 59 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Tecnologia de Alimentos), Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, Francisco Beltrão, 2014.

Depositphotos.com. **Imagem de garrafa com iogurte de morango fresco**. Disponível em: <<https://pt.depositphotos.com/3094052/stock-photo-bottle-with-fresh-strawberry-ogurt.html>> Acesso em: 18 maio 2017.

FAO/WHO Second International Conference on Nutrition (ICN2). **Working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food**. Ontario, Canada; 2002.

FERREIRA, B. **Imagem de coalhada**. Disponível em: <<http://revistagloborural.globo.com/GloboRural/0,6993,EEC1703740-1641,00.html>> Acesso em: 18 maio 2017.

GALLINA, D. A.; ANTUNES, A. E. C.; ZAMBUJA-FERREIRA, N. C.; MENDONÇA, J. B.; NORBONA, R. A. Caracterização de bebida obtida a partir de leite fermentado simbiótico adicionado de polpa de goiaba e avaliação de viabilidade das bifidobactérias. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. Juiz de Fora, v. 67, n. 386, p. 45-54, 2012.

GALLINA, D. A.; TRENTA, F. K. H. S.; ALVES, A. T. S.; CARUSI, J. Caracterização de Leites Fermentados Com e Sem Adição de Probióticos e Prebióticos e Avaliação da Viabilidade de Bactérias Lácticas e Probióticas Durante a Vida-de-Prateleira. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 13, n. 4, p. 239-244, 2011.

GAVA, J. A.; SILVA, C. A. B.; FRIAS, J. R. G. **Tecnologia dos alimentos: princípios e aplicações**. 1. ed. São Paulo: Nobel, 2009. 512 p.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4. ed., 1. ed. Digital. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz. 2008.

ISOLAURI, E.; SALMINEN, S.; OUWEHAND, A. C. Microbial-gut interactions in health and disease. Probiotics. **Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology**, London, v. 18, n. 2, p. 299-313, 2004.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 712 p.

LAZADO, C. C.; CAIPANG, C. M. A.; BRINCHMANN, M. F.; KIRON, V. In vitro adherence of two candidate probiotics from Atlantic cod and their interference with the adhesion of two pathogenic bacteria. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 148, n. 2, p. 252-259, 2011.

LIMA, E. T.; ANDREATTI FILHO, R. L.; OKAMOTO, A. S.; NOUJAIM, J. C.; BARROS, M. R.; CROCCI, A. J. Evaluation in vitro of the antagonistic substances produced by *Lactobacillus* spp. isolated from chickens. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v. 71, n. 2, p. 103-107, 2007.

LMdiets. **Imagem de leites fermentados**. LMdiets - Nutrição Clínica Avançada. 04 abril 2014. Disponível em: <<http://lmdietsportsnutrition.blogspot.com.br/2014/04/>> Acesso em: 18 maio 2017.

LONGO, G. **Influência da adição de lactase na produção de iogurtes**. Dissertação de Mestrado (Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Paraná - UFPR. Curitiba, 2006.

MANACH, C.; MAZUR, A.; SCALBERT, A. Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. **Current Opinion in Lipidology**, v. 16, n. 1, p. 77-84, 2005.

MATSUBARA, S. Alimentos Funcionais: uma tendência que abre perspectivas aos laticínios. **Revista Indústria de Laticínios**, São Paulo, v. 6, n. 34, p. 10-18, 2001.

MOURE, A.; CRUZ, J. M.; FRANCO, D.; DOMÍNGUEZ, J. M.; SINEIRO, J.; DOMÍNGUEZ, H.; et al. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, v. 72, p. 145-171, 2001.

OLIVEIRA, M. M. de. **Avaliação de leite fermentado probiótico preparado com leite submetido à alta pressão dinâmica**. 2013. 123 f. Dissertação de Mestrado (Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2013.

ORDÓÑEZ, J. A. **Tecnologia de Alimentos: Alimentos de Origem Animal**. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 280 p.

O'SULLIVAN, D. J. Primary Sources of Probiotic Cultures. In: AHMEDNA, M.; GOKTEPE, I.; JUNEJA, V. K. **Probiotics in Food Safety and Human Health**. Boca Raton: CRC Press, 2006. Cap. 4, p. 91-108, ISBN: 978-1-4200-2757-0.

PIMENTEL, C. V. de M. B.; FRANCKI, V. M.; GOLLÜCKE, A. P. B. **Alimentos funcionais - Introdução às principais substâncias bioativas em alimentos**. São Paulo: Varela, 2005. 95 p.

PIMENTEL, G. D.; BARBALHO, S. M. Probióticos no Tratamento do Câncer: Aspectos Atuais. **Nutrição em Pauta**, São Paulo, v. 15, n. 84, 2007.

PURWANDARI, U.; SHAH, N. P.; VASILJEVIC, T. Effects of Exopolysaccharide-producing strains of *Streptococcus thermophilus* on technological and rheological properties of set-type yoghurt. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 11, p. 1344–1352, 2007.

RAFTER, J. Lactic acid bacteria and cancer: Mechanistic perspective. **British Journal of Nutrition**, v. 88, n. 1, p. 89-94, 2002.

ROCHA, C.; COBUCCI, R. de M. A.; MAITAN, V. R.; SILVA, O. C. Elaboração e avaliação de iogurte sabor frutos do cerrado. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 26, n. 2, p. 255-266, 2008.

ROCKENBACH, I. I.; GONZAGA, L. V.; RIZELIO, V. M.; GONÇALVES, A. E. de S. S.; GENOVESE, M. I.; FETT, R. Phenolic compounds and antioxidant activity of seed and skin extracts of red grape (*Vitis vinifera* and *Vitis labrusca*) pomace from Brazilian winemaking. **Food Research International**, v. 44, p. 897-901, 2011.

ROCKENBACH, I. I.; JUNGFER, E.; RITTER, C.; SANTIAGO-SCHÜBEL, B.; THIELE, B.; FETT, R.; et al. Characterization of flavan-3-ols in seeds of grape pomace by CE, HPLC-DAD-MSⁿ and LC-ESI-FTICR-MS. **Food Research International**, v. 48, p. 848-855, 2012.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 42, n. 1, p. 1-16, 2006.

SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; MÄTTÖ, J.; MATTILA-SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**, v. 84, p. 197-215, 2000.

SANDERS, M. E. Probiotics: Considerations for Human Health. **Nutrition Reviews**, v. 61, n. 3, p. 91-99, 2003.

SANTOS, R. B.; BARBOSA, L. P. J. de L.; BARBOSA, F. H. F. Probióticos: microrganismos funcionais. **Ciência Equatorial**, Amapá, v. 1, n. 2, p. 26-38, 2011.

SAZAWAL, S.; HIREMATH, G.; DHINGRA, U.; MALIK, P.; DEB, S.; BLACK, R. E. Efficacy of probiotics in prevention of acute diarrhoea: a meta-analysis of masked, randomised, placebo-controlled trials. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 6, n. 6, p. 374-382, 2006.

SENA, J. de L.; AZEVEDO, M. P. R. de; NÓBREGA, S. G. da; LIMA, T. G. D.; AZEVEDO, V. B. de. **Imagem de kumys**. 39 slides. Disponível em: <<https://pt.slideshare.net/110411/leites-fermentados>> Acesso em: 18 maio 2017. Apresentação em Power-point.

SHAH, N. P. Probiotic Bacteria: Selective Enumeration and Survival in Dairy Foods. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 4, p. 894-907, 2000.

SHAH, N. P. Functional cultures and health benefits. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 17, n. 11, p. 1262-1277, 2007.

SILVA, A. M.; BARBOSA, F. H. F.; DUARTE, R.; VIEIRA, L. Q.; ARANTES, R. M. E.; NICOLI, J. R. Effect of *Bifidobacterium longum* ingestion on experimental salmonellosis in mice. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 97, p. 29-37, 2004.

SILVA, L. M. L. R. Caracterização dos Subprodutos da Vinificação. **Revista do ISPV – nº 28**. Outubro de 2003. Disponível em: <<http://www.ipv.pt/millennium/Millennium28/10.pdf>> Acesso em: 25 maio 2017.

SILVEIRA, E. O. da. **Desenvolvimento de bebida láctea fermentada de cabra contendo *Bifidobacterium lactis*, inulina e frutooligossacarídeos**. 2014. 63 f. Dissertação de Mestrado

(Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Centro de Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2014.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144-158, 1965.

TABASCO, R.; SÁNCHEZ-PATÁN, F.; MONAGAS, M.; BARTOLOMÉ, B.; MORENO-ARRIBAS, M. V.; PELÁEZ, C.; et al. Effect of grape polyphenols on lactic acid bacteria and bifidobacteria growth: resistance and metabolism. **Food Microbiology**, v. 28, n. 7, p. 1345-1352, 2011.

TAMIME, A. Y. Fermented Milks. 1a ed. Inglaterra: **Blackwell Publishing**. 2006, 262p.

THAMER, K. G.; PENNA, A. L. B. Caracterização de bebidas lácteas funcionais fermentadas por probióticos e acrescido de prebióticos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 3, p. 589-595, 2006.

VINDEROLA, C. G.; BAILO, N.; REINHEIMER, J. A. Survival of probiotic microflora in Argentinian yoghurts during refrigerated storage. **Food Research International**, v. 33, n. 2, p. 97-102, 2000.

VUYST, L. De.; ZAMFIR, M.; MOZZI, F.; ADRIANY, T.; MARSHALL, V.; DEGEEST, B.; et al. Exopolysaccharide-producing *Streptococcus thermophilus* strains as functional starter cultures in the production of fermented milks. **International Dairy Journal**, v. 13, p. 707-717, 2003.

WANG, M. F.; LIN, H. C.; WANG, Y. Y.; HSU, C. H. Treatment of perennial allergic rhinitis with lactic acid bacteria. **Pediatric allergy and immunology**, Copenhagen, v. 15, p. 152-158, 2004.

WARD, R. E.; NIÑONUEVO, M.; MILLS, D. A.; LEBRILLA, C. B.; GERMAN, J. B. In Vitro Fermentation of Breast Milk Oligosaccharides by *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus gassier*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 6, p. 4497-4499, 2006.

ZACARCHENCO, P. B.; MASSAGUER-ROIG, S. Avaliação sensorial, microbiológica e de pós-acidificação durante a vida-de-prateleira de leites fermentados contendo *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium longum* e *Lactobacillus acidophilus*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 4, p. 674-679, 2004.